

## 明 細 書

抗ヒト免疫不全ウイルス感染防御用キメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクター

## 技術分野

[0001] 本発明は、抗ヒト免疫不全ウイルス感染防御用キメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターに関する。更に詳細には、本発明は、非増殖型 5 型アデノウイルスに、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のエンベロープ蛋白をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれ、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が 11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子に発現可能なように置換されてなるキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターおよびその医薬用途に関する。

## 背景技術

[0002] 高活性抗レトロウイルス療法 (HAART) は、HIV 感染患者の死亡率減少にめざましい効果を發揮している。しかしながら、HAART には副作用と抵抗性の発生率が高いという問題点があり、発展途上国においてはその治療薬の入手が困難であるのが現状である。さらに、HAART には HIV 感染の予防薬としての効果はなく、これからの AIDS 対策において、安全性かつ有効性の高いワクチンの開発は非常に重要な課題であると言える。

HIV 感染に対する防御機構において、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が中和抗体以上に重要な役割を果たしているという報告が数多くなされている (非特許文献1、非特許文献2および非特許文献3)。そのため過去 10 年間、細胞性免疫を増強することを目的とした多様なワクチンが開発されてきた。HIV サブユニットペプチドワクチン、DNA ワクチン、組換えウイルスベクターワクチン (組換えワクチニアウイルス Ankara 株 (rMVA)) (非特許文献3および非特許文献4)、アデノウイルス (非特許文献5)、狂犬病ウイルス (非特許文献6)、フラビウイルス (非特許文献7)、friend マウス白血病ウイルス (非特許文献8)、ベネズエラ馬脳炎ウイルス (非特許文献9)、水泡性口炎ウイルス (非特許文献10)、アデノ随伴ウイルス (非特許文献11および非特許文

献12)、細菌ベクターワクチン(bacille Calmette-Guerin) (非特許文献13)、乳酸菌(非特許文献14)などである。これらのワクチンは、単独あるいは複合で用いることによってウイルスに対する防御効果を示し、さらにこれらのうちいくつかはヒト以外の霊長類でのウイルス感染実験において AIDS の進行を食い止めることが報告されている(非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献8、非特許文献15および非特許文献16)。DNA で初回免疫を行い rMVA で追加免疫を行う複合型ワクチンは、もっとも成果をあげている方法のひとつであり、現在フェーズ I 臨床試験が行われている。

- [0003] ウイルスベクターとして期待されている 5 型アデノウイルス (Ad5) は rMVA よりも強い免疫原性を持っており(非特許文献5)、ウイルス力価が高いという利点をはじめ、DNA 配列など生物学的特徴についてもよく研究されている。しかしながら、Ad5 は肝細胞に対する親和性が非常に高く(非特許文献17)、オルニチン・トランスカルバミラーゼ(OTC)欠損症の治療のために Ad5 ベクターを投与した患者が死亡した例も報告されており(非特許文献18)、臨床治療用ベクターとしては使用が制限されている。

アデノウイルスには 51 の血清型があり、これらは 6 つの亜属(AからF)に分類される。現在アデノウイルスベクターによる遺伝子導入系のほとんどは、2 型あるいは 5 型アデノウイルス(Ad2、Ad5 とともにCに属する)を用いている。なぜなら、Ad2 および Ad5 はもっともよく研究されており、DNA 配列まで明らかになっているためである(非特許文献19および非特許文献20)。これまでの研究から、3 型アデノウイルス(Ad3)、11 型アデノウイルス(Ad11)、35 型アデノウイルス(Ad35)、50 型アデノウイルス(Ad50) (非特許文献21および非特許文献22)以外のアデノウイルスの多くは(非特許文献7、非特許文献9、非特許文献13、非特許文献15、非特許文献22、非特許文献23、非特許文献24、非特許文献25、非特許文献26)、coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) に結合することが知られている。CAR は、ヒトにおいて心臓、膵臓、中枢・末梢神経系、前立腺、睪丸、肺、肝臓、腸に発現しているが、中でも肝臓に極めて多く発現している。そのため Ad5 はヒトおよび動物において肝臓に感染しやすいと考えられている。

[0004] Ad5 を利用したワクチンとして、DNAワクチンによる初回免疫、Ad5 ベクターによる追加免疫を行う複合型ワクチンは、サルを用いた SHIV 感染実験においてめざましい感染防御効果を示すことが報告されている(非特許文献27)。しかしながら、Ad5 は特に肝細胞に対する親和性が非常に高いために肝毒性を惹起しやすく、そのためウイルスベクターワクチンとしての安全性が懸念されている。

非特許文献1: Haynes, B. F. et al., Science 271:324-328, 1996

非特許文献2: Miedema, F. et al., Science 272:505-506, 1996

非特許文献3: Robinson, H. et al., Nat. Med. 5:526-534, 1999

非特許文献4: Amara, R. R. et al., Science 292:69-74, 2001

非特許文献5: Shiver, J. W. et al., Nature 415:331-335, 2002

非特許文献6: Schnell, M. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3544-3549, 2000

非特許文献7: Mandl, C. W. et al., Nat. Med. 4:1438-1440, 1998

非特許文献8: Matano, T. et al., Vaccine 18:3310-3318, 2000

非特許文献9: Caley, I. J. et al., Vaccine 17:3124-3135, 1999

非特許文献10: Rose, N. F. et al., Cell 106:539-549, 2001

非特許文献11: Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 13:1571-1581, 2002

非特許文献12: Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 12:1047-1061, 2001

非特許文献13: Aldovini, A. et al., Nature 351:479-482, 1991

非特許文献14: Xin, K.-Q. et al., Blood 102:223-228, 2003

非特許文献15: Barouch, D. H. et al., J. Virol. 75:5151-5158, 2001

非特許文献16: Barouch, D. H. et al., Science 290:486-495, 2000

非特許文献17: Adams, J. Y. et al., Nat. Med. 8:891-896, 2002

非特許文献18: Thomas, C. E. et al., Nat. Reviews Genetics 4:346-358, 2003

非特許文献19: Chroboczek, J. et al., Virol. 186:280-285, 1992

非特許文献20: van Ormondt, H. et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110:73-142, 1984

非特許文献21: Shayakhmetov, D. M. et al., J. Virol. 74:2567-2583, 2000

非特許文献22: Stevenson, S. C. et al., J. Virol. 69:2850-2857, 1995

非特許文献23:Amara, R. R. et al., J. Virol. 76:7625-7631,2002

非特許文献24:Farina, S. F. et al., J. Virol 75:11603-13,2001

非特許文献25:Jounai, N. et al., J. Gene Med. 5:609-617,2003

非特許文献26:Lieber, A. et al., J. Virol. 70:8944-8960,1996

非特許文献27:Lubeek, M.D. et al., Cell 106:539-549,1997

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明の課題は、より安全性が高く、かつ有効性の高い HIV ワクチンとして利用可能な Ad5 を用いた新たなウイルスベクターを提供することにある。更には、該ウイルスベクターを有効成分とする医薬組成物であって、抗 HIV 感染防御用、HIV ワクチン用、複合型ワクチン用に用いる医薬組成物を提供することにある。また、該ウイルスベクターを用いた HIV 感染防御もしくは HIV 用ワクチン化方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、より安全性が高く、かつ有効性の高い HIV ワクチンの開発を目指して鋭意研究を進めた。そこで、HIV 遺伝子を発現し、Ad35 ファイバーを持つ Ad5 キメラベクターを作製した。このキメラベクターの誘導する抗原特異的免疫反応を BALB/c マウス を用いて試験したところ、キメラベクターの筋注投与により、同力価の組換えワクチニアウイルス (Ankara 株) ベクターや増殖型組換えワクチニアウイルス (WR 株) ベクターに比べて、非常に強い HIV 特異的な細胞性免疫反応が惹起されることが明らかになった。さらに、DNA ワクチンによる初回免疫、このキメラベクターによる追加免疫は、追加免疫後 7 週間目において、HIV 遺伝子を発現するワクチニアウイルスの感染を完全に防いだ。この知見は、DNA ワクチンおよびこのキメラベクターを用いた複合型ワクチンが、AIDS の蔓延を抑制する画期的なワクチンになりうることを示唆している。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。
- [0007] 従って、本発明は、非増殖型 5 型アデノウイルスに、ヒト免疫不全ウイルスのエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれており、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバーをコードする遺伝子が、11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同

様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されているキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターに関する。

更に、本発明は、上記キメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターを有効成分とする医薬組成物に関する。この医薬組成物は、抗ヒト免疫不全ウイルス感染防御に、更には抗ヒト免疫不全ウイルス用ワクチンに用いることができる。また、抗ヒト免疫不全ウイルス遺伝子が発現可能なように組み込まれた非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターとともに用いる複合型ワクチンとして利用できる。また、抗 HIV 剤とともに用いることもできる。

更に、本発明は、上記のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターおよび HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれた非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを投与することからなる、HIV 感染防御もしくは HIV 用ワクチン化方法に関する。

更に、本発明は、上記のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターおよび抗 HIV 剤を投与することからなる、HIV 感染防御もしくは HIV 用ワクチン化方法に関する。

### 発明の効果

- [0008] 本発明で提供されるキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、強い抗原特異的細胞性免疫反応を惹起することができる。これは現在抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)ワクチンとして最有力視されている MVA ベクター以上に強い免疫反応である。さらに、マウスモデルにおいて、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターと DNA ワクチンを組み合わせた複合型ワクチンが、ウイルス感染に対する長期的な防御反応を誘導することもできる。従って、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、AIDS の蔓延を抑制する画期的な HIV ワクチンの開発の可能性を示唆している。また、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、高活性抗レトロウイルス療法 (HAART) に用いられている抗 HIV 剤とともに用いることにより、HIV 感染の治療および予防効果を強力に発揮することもできる。更には、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイ

ルスベクターは、5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に置換されているため、肝臓に対する毒性が軽減され、かつ樹状細胞への親和性が向上したものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0009] 本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、非増殖型 5 型アデノウイルスに、HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれ、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が 11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されたものである。

本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターを構築するために用いる非増殖型 5 型アデノウイルスとしては、初期遺伝子 E1 あるいは初期遺伝子 E1 および E3 が除去された 5 型アデノウイルスが好ましい。HIV のエンベロープ蛋白 (env) としては、HIV 1 型、HIV 2 型などのいずれのタイプの HIV のエンベロープ蛋白であってもよい。また、HIV 1 型については、種々のクレード (亜型) が知られており、クレード A 型、クレード B 型、クレード C 型、クレード D 型、クレード E 型などのいずれのタイプの HIV のエンベロープ蛋白であってもよい。エンベロープ蛋白をコードする遺伝子およびそのアミノ酸配列は周知であり、Gao, F., et al., J. Virol. 70(3), 1651-1667 (1996); Ratner, L., et al., Nature 313 (6000), 277-284 (1985); Jounai, N. et al., J. Gene Med., 5, 609-617 (2003); Kim, F.M., et al., J. Virol. 69(3), 1755-1761 (1995); Rodenburg, C.M., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 17(2), 161-168 (2001); Gao, F., et al., J. Virol. 72(7), 5680-5698 (1998); Gao, F. et al., J. Virology 70(10), 7013-7029 (1996) などに記載されており、また NCBI のジーンバンクから遺伝子情報 No. U51190、K03455、U39362、AF286224、U88822、U51188 として入手可能である。本発明では、エンベロープ蛋白をコードする遺伝子に限られず、エンベロープ蛋白と同様の免疫原性を有するその変異体をコードする遺伝子であってもよい。このような変異体としては、エンベロープ蛋白のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換および/または付加されたアミ

ノ酸配列からなる蛋白であってエンベロープ蛋白と同様の免疫原性を有する蛋白が挙げられる。また、エンベロープ蛋白をコードする遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、エンベロープ蛋白と同様の免疫原性を有する蛋白をコードする遺伝子でもよい。ストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子としては、例えば、6×SSPE、2×デンハルト溶液、0.5% SDS、0.1mg/ml サケ精巢 DNA を含む溶液中で65℃、12 時間反応させる、という条件下でサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、ハイブリダイズする遺伝子などが挙げられる。本発明では、クレード B 型 HIV またはクレード C 型 HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が好ましい。

また、HIV のエンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子とともに、HIV の gag 遺伝子もしくはその変異遺伝子が組み込まれたキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターであってもよい。gag 遺伝子は、HIV のコアタンパク質をコードする遺伝子であり、その遺伝子配列およびそれによってコードされるアミノ酸配列は公知であり、Gao, F., et al., J. Virol. 70(3), 1651-1667 (1996); Ratner, L., et al., Nature 313 (6000), 277-284 (1985); Jounai, N. et al., J. Gene Med., 5, 609-617 (2003); Kim, F.M., et al., J. Virol. 69(3), 1755-1761 (1995); Rodenburg, C.M., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 17(2), 161-168 (2001); Gao, F., et al., J. Virol. 72(7), 5680-5698 (1998); Gao, F. et al., J. Virology 70(10), 7013-7029 (1996) などに記載されており、また NCBI のジーンバンクから遺伝子情報 No. U51190、K03455、U39362、AF286224、U88822、U51188 として入手可能である。gag 遺伝子の変異遺伝子であってもよい。ここで変異遺伝子とは、gag 遺伝子がコードする蛋白質と同様の機能を有する蛋白をコードする遺伝子であり、上記したエンベロープ蛋白の変異体の場合と同様に、gag 遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなる蛋白であって gag 遺伝子がコードする蛋白質と同様の機能を有する蛋白をコードする遺伝子、あるいは gag 遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、gag 遺伝子がコードする蛋白質と同様の機能を有する蛋白をコードする遺伝子が挙げられる。

[0010] エンベロープ蛋白またはこれらの変異体をコードする遺伝子、あるいは gag 遺伝子またはその変異遺伝子は、周知の遺伝子情報に基づいて PCR 法等を利用する周知の方法により得ることができる。これらの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。また、上記した変異体をコードする遺伝子あるいはストリンジエントな条件でハイブリダイズする遺伝子は、例えば部位特異的突然変異誘発法、通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には上記 Molecular Cloning 等の基本書を参考にして行うことができる。

本発明では、HIV のエンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子と共に HIV の調節遺伝子である rev 遺伝子 (Gao, F., et al., J. Virol. 70(3), 1651-1667 (1996); Ratner, L., et al., Nature 313 (6000), 277-284 (1985); Jounai, N. et al., J. Gene Med., 5, 609-617 (2003); Kim, F.M., et al., J. Virol. 69(3), 1755-1761 (1995); Rodenburg, C.M., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 17(2), 161-168 (2001); Gao, F., et al., J. Virol. 72(7), 5680-5698 (1998); Gao, F. et al., J. Virology 70(10), 7013-7029 (1996); NCBI ジーンバンクの遺伝子情報 No. U51190、K03455、U39362、AF286224、U88822、U51188)を用いてもよい。

これらの HIV のエンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子、更には gag 遺伝子またはその変異遺伝子を、必要に応じて rev 遺伝子と共に、発現可能なように非増殖型 5 型アデノウイルスに組み込むには、例えば、CMV プロモーター (サイトメガロウイルスプロモーター)、CAG プロモーター (CMV プロモーターとニワトリ  $\beta$  アクチンプロモーターのキメラプロモーター) の下流に、gag 遺伝子またはその変異遺伝子、rev 遺伝子、エンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子、次いでポリ A 遺伝子からなる発現ユニットの両端に 5 型アデノウイルスと同じ遺伝子を接続し、ヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞中で相同組換えにより導入することにより行うことができる。

[0011] 本発明で用いる 11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子およびそのアミノ酸配列は既に公知であり、Mei, Y.F. et al., Virology 206 (1), 686-689, 1995; Dmitry M. et al., J. Virology, Mar. 2000, vol.74, 2567-2583; NCBI



U10272; NCBI AAA66361.1; Stone, D. et al., Virology, 2003, Vol.309, 152-156 などに記載されている。ファイバー蛋白は、shaft と knob から構成され、本発明では通常これらから構成されるファイバー蛋白をコードする遺伝子を用いる。本発明では、ファイバー蛋白をコードする遺伝子に限られず、ファイバー蛋白と同様の標的細胞への接着性を有するその変異体をコードする遺伝子であってもよい。このような変異体としては、ファイバー蛋白のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなる蛋白であってファイバー蛋白と同様の標的細胞への接着性を有する蛋白が挙げられる。また、ファイバー蛋白をコードする遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、ファイバー蛋白と同様の標的細胞への接着性を有する蛋白をコードする遺伝子でもよい。ストリンジントな条件としては、例えば、上記した HIV のエンベロープ蛋白の場合と同様の条件などが挙げられる。

ファイバー蛋白またはこれらの変異体をコードする遺伝子は、エンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子の場合と同様に、上記した既に周知の方法により容易に得ることができる。

これらの 11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子を、非増殖型 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子と置換し、発現可能なように非増殖型 5 型アデノウイルスに組み込むには、例えば、11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子の両端に 5 型アデノウイルスのファイバー以外の遺伝子を接続した DNA をヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞にトランスフェクションすることにより達成することができ、かくしてキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターを構築できる。

[0012] また、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、以下に説明するように、市販されているキットを用いて容易に構築することもできる。

即ち、例えば、E1、E3 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子が発現可能なように導入され、かつ該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に発現可能なように置換

された本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA)のキットを用いて容易に作製することができる。より詳細には、例えば、CAG プロモーター、HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子並びにポリ A 遺伝子を有する遺伝子断片 (CAG promotor-HIV IIIB rev/env-polyA)を、Jounai, N. et al., J. Gene Med. 5:609-617,2003 に記載された pCAGrev/env から 5.2k bp Sal I/Pst I 断片として単離する。Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA)のキットには、Left hand shuttle plasmid として、5 型アデノウイルス (Ad5) の 22-342 部位および Ad5 3523-5790 部位を相同組換え用に有し、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドベクター pLHSP と、Right hand shuttle plasmid として、E1、E3 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子 (Ad35 shaft と Ad35 knob) に発現可能なように置換されたキメラシャトルプラスミドベクター pRHSP 5/35 が含まれている。

- [0013] まず、Ad5 22-342 部位、Ad5 3523-5790 部位、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミド pLHSP に、CAG promotor-HIV IIIB rev/env-polyA を有する 5.2k bp Sal I/Pst I 断片が導入された pLHSP-HIV シャトルプラスミドを作製するために、この 5.2kbp 断片を プラスミドベクター pLHSP のマルチクロニングサイトの一つである Eco R I サイトに挿入する。次いで、得られた pLHSP-HIV シャトルプラスミドは Pac I で切断して直鎖状にした後に、キメラシャトルプラスミドベクター pRHSP 5/35 とともに、リン酸カルシウム法で HEK 293 細胞にトランスフェクションする。トランスフェクション後 7 から 14 日間、プレート培地でブラークを培養することにより、目的とする本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルス (Ad5/F35-HIV)を得ることができる。

このような方法により、他の本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターも同様に作製することができる。

- [0014] 本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、非常に強い HIV 特異的細胞性免疫反応を惹起することができる。更には、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に置換されているため、肝臓に対する毒性が軽減され樹状細胞への親和性が向上したものである。

従って、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、HIV 感染防御用の医薬として、また HIV 用ワクチンとして極めて有効である。また、HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれた通常の非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターと共に用いることによって、一段とその強い HIV 特異的細胞性免疫反応を惹起することができるため、これらの通常の非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターと共に用いる複合型の HIV 用ワクチンとして極めて有効である。

これらの非増殖型ウイルスベクターとしては、例えば、2 型もしくは 5 型アデノウイルスの初期遺伝子 E1 を HIV のエンベロープ蛋白を発現する遺伝子ユニットで置換した組換えアデノウイルス、あるいはワクチニアウイルスに HIV のエンベロープ蛋白を発現する遺伝子ユニットを導入した非増殖型組換えワクチニアウイルスなどが挙げられる。非ウイルスベクターとしては、哺乳動物細胞用に通常用いられる pCAGGS (Gene 108: 193-200, 1991)、pBK-CMV、pcDNA3.1、pZeoSV (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などの発現用ベクターに、HIV のエンベロープ蛋白を発現する遺伝子ユニットを導入した非ウイルスベクターなどが挙げられる。

また、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、高活性抗レトロウイルス療法 (HAART) に用いられている抗 HIV 剤とともに用いることもできる。抗 HIV 剤としては、逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤などが挙げられる。逆転写酵素阻害剤は、HIV の RNA 遺伝子がヘルパー T 細胞にある正常な DNA に逆転写する酵素の働きを阻害する薬剤であり、アジドチミジン (AZT)、ジダノシン (ddI)、ラブミジン (3TC)、ネビラピン (NVP) などが例示される。プロテアーゼ阻害剤は、HIV ウイルスが転写された DNA から作られるタンパク質を新たに HIV ウイルスに組み立てようとするときに働く酵素であるプロテアーゼを阻害するものであり、インジナビル (IDV)、サキナビル (SQV)、リトナビル (RTV)、ネルフィナビル (NFV) などが例示される。

[0015] 本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターをヒトへ投与する方法としては、以下に記載する方法が挙げられる。

即ち、例えば、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターを

適当な溶剤、例えば、PBS 等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填して注射剤を調製して、ヒトへ注射することにより投与される。注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えてもよい。また、凍結乾燥して製剤化することもできる。本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、静脈、筋肉、腹腔、皮下、皮内等に投与することもでき、また経鼻、経口投与することができる。

本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターの投与量は、投与する対象、投与方法、投与形態等によって異なるが、通常成人 1 人当たり  $10^9$ – $10^{13}$  ウイルス粒子数の範囲、好ましくは  $10^{11}$ – $10^{12}$  ウイルス粒子数の範囲である。

本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターを、上記したように、通常の非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター、あるいは抗 HIV 剤とともに投与する場合にも、上記と同様の投与方法、投与量で投与することができ、また、非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター、あるいは抗 HIV 剤は、通常採用されている投与方法、投与量で投与することができる。

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

### 実施例 1

#### [0016] (1) 本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターの構築

E1、E3 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、クレード B 型の HIV 株である HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子が発現可能なように導入され、かつ該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に発現可能なように置換された本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターを、以下に記載するように、Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA)のキットを用いて作製した。

CAG プロモーター、HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子並びにポリ A 遺伝子を有する遺伝子断片 (CAG promotor–HIV IIIB rev/env–polyA) は、Jounai, N. et al., J. Gene Med. 5:609–617, 2003 に記載された pCAG rev/env から 5.2k bp Sal I/Pst I 断片として単離することにより得た。

Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA)から購入したキットには、Left hand shuttle

plasmid として、Ad5 22-342 部位、Ad5 3523-5790 部位、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドベクター pLHSP と、Right hand shuttle plasmid として、E1、E3 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子(Ad35 shaft と Ad35 knob)に発現可能なように置換されたキメラシャトルプラスミドベクター pRHSP 5/35 が含まれている。

- [0017] まず、Ad5 22-342 部位、Ad5 3523-5790 部位、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミド pLHSP に、CAG promotor-HIV III B rev/env-polyA を有する 5.2k bp Sal I/Pst I 断片が導入された pLHSP-HIV シャトルプラスミドを作製するために、この 5.2kbp 断片を プラスミドベクター pLHSP のマルチクローニングサイトの一つである Eco R I サイトに挿入した。次いで、得られた pLHSP-HIV シャトルプラスミドは Pac I で直鎖状にした後に、キメラシャトルプラスミドベクター pRHSP 5/35 とともに、リン酸カルシウム法で HEK 293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後 7 から 14 日間、プレート培地でプラークを培養した。

目的とする本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルス(Ad5/F35-HIV)は HEK 293 細胞内で増殖させ、CsCl 精製法で 2 回精製して得た。

[0018] (2) その他の組換えベクター

以後の実験に用いた組換えベクターは以下に示すようにして入手した。

HIV env を発現する非増殖型ワクチニアウイルス(Ankara strain, MVA-HIV)(Amara, R. R. et al., Science 292:69-74,2001; Amara, R. R. et al., J. Virol. 76:7625-7631,2002; Robinson, H. et al., Nat. Med. 5:526-534,1999)は、Dr. Moss (Laboratory of Viral Diseases, National Institutes of Health, MD)から提供された。HIV env を発現する増殖型ワクチニアウイルス(WR strain, vPE16)は、AIDS Reagent Program, National Institutes of Health, MD (Cat. No. 362)から購入した。これらの組換えワクチニアウイルスは、それぞれ初代培養チキンペロ細胞と CV1 細胞で増殖させた。

- [0019] E1、E3 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、ガラクトシダーゼZ(LacZ)をコードする遺伝子が発現可能なように導入され、かつ該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に発現可能なように置換されたキメラ 5

型/35 型アデノウイルスベクター (Ad5/F35-LacZ) とガラクトシダーゼ Z (LacZ) を発現する E1、E3 欠損非増殖型 5 型アデノウイルス (Ad5-LacZ) についてはすでに報告されている (Mizuguchi, H. et al., Gene 285:69-77, 2002)。

組換えウイルスの力価はスペクトロフォトメーターで測定し、 $1 \text{ OD}_{260} = 10^{12}$  particles =  $10^{10}$  plaque forming unit (PFU) として算出した。HIV IIIB rev および env 遺伝子を持つ DNA ワクチン (pCAG rev/env) についてはすでに報告されている (Jounai, N. J. Gene Med., 5:609-617, 2003)。

[0020] (3) 組換えウイルスの発現

1) 方法

組換えウイルスの発現を確認するために、MVA-HIV、vPE16 (HIV env 発現自己増殖型ワクチニアウイルス WR 株)、Ad5/F35-HIV を同量の 2 x SDS 緩衝液 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% グリセロール、0.01% ブロモフェノールブルー、10%  $\beta$ -メルカプトエタノール) に溶解した。10 分間煮沸した後、この溶液を 4-12% 勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後、Hybond ECL ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) に転写し、マウス抗 HIV gp120 モノクローナル抗体 (hybridoma 902, AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institute of Health, MD) で gp160 を検出した。その後、affinity-purified horseradish peroxidase (HRP) ラベル抗マウス Ig (ICN Pharmaceuticals, Inc, OH) で処理し、ECL Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて X 線フィルムに感光した。

[0021] 2) 結果

MVA-HIV、vPE16、Ad5/F35-HIV の発現を in vitro で確認した。その結果を図 1 に示した。図 1 から分かるように、ウイルスを含む lysates では gp160 が検出されたが、293 細胞 lysates では検出されず、ウイルスベクターの感染によって HIV 遺伝子が発現していることが確認された。

実施例 2

[0022] 組換えウイルスの評価

(1) 方法

### 1) 実験動物と免疫方法

8 週齢のメス BALB/c マウスは Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan から購入し、12 時間ごとの昼夜サイクルが保たれている動物センターで飼育した。免疫方法は、図2 に示したとおりである。複合型ワクチンは、0 週目、1 週目、2 週目に i.m. で PBS に溶解した 100  $\mu$ g pCAG rev/env あるいは pCAG empty DNA (pCAG rev/env から rev/env を除いたプラスミド) を投与、3 週目に  $10^{10}$  particles Ad5/F35-LacZ を i.m. 投与、Ad5/F35-HIV を i.m. あるいは i.d. で投与した。ウイルススペクターのみの投与群は、PBS に溶解した  $10^{10}$  particles Ad5/F35-LacZ あるいは Ad5/F35-HIV を i.m.、i.p.、s.c. あるいは i.d. で投与した。

### [0023] 2) テトラマーアッセイ

テトラマーアッセイは最終免疫から 1 週間後に行った。PE 結合 H-2Dd/p18 テトラマー (RGPGRAFVTI) は AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institute of Health, MD から購入した。テトラマーアッセイの方法は、Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 13:1571-1581, 2002 に示されている方法を用いた。単離したリンパ球は PBS に溶解した 4% マウス血清で 4°C 30 分間ブロッキングし、その後、0.5  $\mu$ g/ $10^6$  cells 抗マウス CD8-FITC 抗体 (Ly-2, PharMingen) を用いて 4°C 30 分間染色した。staining buffer (3% FCS, 0.1% NaN<sub>3</sub> in PBS) で 2 回洗浄した後、テトラマー溶液とともに 37°C で 15 分間インキュベートし、その後フローサイトメーター (Becton Dickinson) で分析を行った。

### [0024] 3) 細胞質内サイトカイン染色 (ICCS) アッセイ

IFN $\gamma$ -産生 CD8<sup>+</sup> T 細胞の検出は、the manufacturer's instructions (Cytofix/CytoPerm Plus kit, PharMingen, San Diego, CA) に示されている方法で行った。マウスの脾臓からリンパ球を単離し、それを HIV V3 ペプチド (NNTRKRIQRGPGRAFVTIGKIGN) 10  $\mu$ g/ml とともに 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション終了 2 時間前に GolgiPlug 1  $\mu$ g/ml を加えた。インキュベーション終了後、細胞は staining buffer (3% FCS, 0.1% NaN<sub>3</sub> in PBS) で洗浄し、4% マウス血清でブロッキングした後、phycoerythrin (PE) ラベル抗マウス CD8 抗体 (Ly-2, PharMingen) で染色した。染色後、細胞を Cytofix/CytoPerm solution 250 l に溶解し

て 4℃ 20 分間静置した。Perm/Wash solutionで洗浄した後、FITC ラベル抗マウス IFN-抗体 (PharMingen)を用いて 4℃ 30 分間染色し、フローサイトメーターで分析した。

[0025] 4) 組換えワクチニアウイルスの感染実験

ウイルス感染実験は、Belyakov, I. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:1709-1714,1998 および Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 13:1571-1581,2002 に示されている方法で行った。感染にはHIV-1 IIIB env 遺伝子を発現する組換えワクチニアウイルス vPE16 (AIDS Reagent Program, NIH, MD; Cat. No. 362)を用いた。まず、本発明のキメラアデノウイルスベクター Ad5/F35-HIV 接種から 2 または 7 週間後のマウスに、 $10^8$  PFU の vPE16 を腹腔内投与で感染させた。感染後 6 日目にマウスから卵巣を摘出し、その卵巣細胞を超音波によってよくほぐした後、CV1 細胞のプレートにおける10倍希釈ごとの vPE16 のウイルス力価を調べた。感染した細胞はクリスタルバイオレットで染色し、おのおのの濃度におけるプラーク数を計測した。

[0026] 5) データ解析

値はすべて平均±標準誤差(S.E.)で示した。データは一元配置分散分析によって統計処理し、有意水準 5% で検定を行った。

[0027] (2) 結果

1) アデノウイルスベクターの肝臓および腎臓に対する細胞毒性

マウスに  $10^{11}$  particles (免疫時の 10 倍の濃度)の Ad5-LacZ と Ad5/F35-LacZ を、i.v. あるいは i.p. により投与した。投与後 6 日目に、Kitayama Rabesu Corp., Nagano, Japan に依頼し、これらの肝臓および腎臓に対する毒性試験を行った。図3の結果から見て取れるように、Ad5-LacZ 投与群は Ad5/F35-LacZ 投与群に比べて i.v. と i.p. でそれぞれ 10 倍、2 倍高い GOT、GPT を示した。腎臓に対する毒性は、Ad5-LacZ 投与群、Ad5/F35-LacZ 投与群において大きな差はなかった。

[0028] 2) 免疫反応のタイムコース

0 日目に Ad5/F35-HIV ( $10^{10}$  particles/mouse) を i.m.、i.d.、i.p. あるいは s.c. でマウスに投与し、ネガティブコントロールとして Ad5/F35-LacZ ( $10^{10}$  particles/mouse)を



i.m. 投与した。免疫したマウスにおける HIV 特異的免疫反応は、テトラマーおよび細胞質内サイトカイン染色 (ICCS) アッセイで検出した。図4に示すように、免疫反応の強さは、全ての投与方法において 14 日目に最大になりそれ以降は徐々に減少した。図4における大きさ(i.m. > i.d. > i.p. > s.c.)は、HIV 特異的な細胞性免疫反応の強さを反映しており、ICCS アッセイにおいても同様の結果が得られた(図5)。バックグラウンド(Ad5/F35-LacZ 投与群)値は、テトラマーアッセイでは 0.15% 以下、ICCS アッセイでは 0.13% 以下であった。したがって以降の免疫には i.m.、i.d. 投与方法を用いることにした。

[0029] 3)pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV免疫による長期性の細胞性免疫の惹起

HIV 特異的な細胞性免疫を検出するために 2 種類のアッセイ法(テトラマー染色、細胞質内サイトカイン染色 (ICCS))を行った。最終免疫後 2 週間目において、i.d. あるいは i.m. による Ad5/F35-HIV 投与群は、DNA ワクチン(pCAGrev/env)投与群の 6 倍以上の IFN- $\gamma$  産生 HIV 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導した(図6)。また、Ad5/F35-HIV は、HIV ワクチンの有望な候補である MVA-HIV、vPE16 よりも約 2 倍強い細胞性免疫を惹起し、さらに、pCAGrev/env と Ad5/F35-HIV による複合型ワクチンは、Ad5/F35-HIV のみ投与した場合と比較して 3 倍以上強い免疫応答を誘導した。これらの結果は ICCSアッセイでも同様に観察された(図7)。また、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV 免疫を行ったマウスにさらに追加免疫を行っても、HIV 特異的な細胞性免疫応答はほとんど増加しなかったことから(i.d. と i.p. 投与、それぞれ 18%、19% から 20%、21% に増加)(図8)、このワクチンはほぼ最高値に近い抗原特異的免疫反応を惹起させることが示唆された。

[0030] Ad5/F35-HIV 投与によって誘導された免疫応答が実際に生体防御に寄与するか確認するために、最終免疫後 2 週間目のマウスに、HIV env 遺伝子を発現するワクチニアウイルス vPE16 を腹腔内感染させた。その結果、図9に示すように、Ad5/F35-HIV 投与群、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV 投与群ともに、ウイルスの感染を完全に防御し、このワクチンが生体防御に寄与していることが明らかになった。

次に、このワクチンが長期的な免疫応答を生み出すことができるかどうかについて調べた。その結果、最終免疫後 7 週間目においても、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV

ワクチン接種した群において高いレベルの HIV 特異的な細胞性免疫応答が確認された(i.d. と i.m. 免疫でそれぞれ 8% と 9%) (図10)。また、最終免疫後 7 週間目に vPE16 の感染実験を行ったが、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV ワクチンの投与によってウイルス感染は完全に防御され(図11)、このワクチンが長期的な免疫応答を誘導できることが明らかになった。

また、図12に示すように、本発明の Ad5/F35-HIV は、MVA-HIV の 1000 倍ものウイルス力価を有する。

### 実施例 3

#### [0031] (1) クレード C 型 HIV の env 遺伝子と gag 遺伝子を含むキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターの構築

E1、E3 欠損非増殖型5型アデノウイルスに、クレード C 型 HIV (96ZM651.8株) の env 遺伝子(gp120、2kbp)と gag 遺伝子(1.5kbp)が発現可能なように導入され、かつ該5型アデノウイルスのファイバーが35型アデノウイルスのファイバー遺伝子が発現可能なように置換された本発明のキメラ5型/35型アデノウイルスを以下に記載するように、遺伝子相同組換え法により作成した。

クレード C 型 HIV (96ZM651.8株) の全長の env gp120 遺伝子(2kbp、C/gp120)および gag 遺伝子(1.5kbp、C/gag) (GeneBank No. AF286224) は、組換えワクシニアウイルス vT331 株 (Gao F. et al., J. Virol., 1998, Vol. 72, 5680-5690) で増幅した。

C/gp120 および C/gag の DNA 断片は、以下のプライマーを用いて PCR 法により作成した。

C/gp120-5'プライマー aagaattcctcgagaaaatgagagtgagggagatact

C/gp120-3'プライマー aatctagatttttctctctccaccactctcc

C/gag-5'プライマー aagtcgacaaaatgggtgagagcggtcaatat

C/gag-3'プライマー aatctagattgagacaaggggtcgctgcaaaa

得られた C/gp120 および C/gag の DNA 断片のそれぞれを IgG F<sub>c</sub> 遺伝子 (Barouch, D.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 4192-4197 (2000)) にライゲートし、C/gp120-Ig および C/gag-Ig を作成した。C/gp120-Ig および C/gag-Ig は、それぞれ pIRES プラスミド (Cloneteck 社製) の XhoI および SalI の位置でクローニング

し、C/gp120-Ig-IRES-C/gag-Ig を得た。次に C/gp120-Ig-IRES-C/gag-Ig 断片を、pCAGGS プラスミド (Jounai, N. et al., J. Gene Med., 5, 609-617 (2003)) の XhoI の位置にサブクローニングした。CAG promoter-C/gp120-Ig-IRES-C/gag-Ig-polyA 断片を Avior Therapeutics, Inc から購入した LHSP ベクターのマルチクローニングサイトの EcoRI サイトに挿入し、pLHSP-HIVクレードCシャトルプラスミドを作成した。pLHSP-HIVクレードCシャトルプラスミドは Ad5/35 の pRHSP シャトルベクターとともに、リポフェクション試薬(リポフェクトアミン2000)を用いてHEK293 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後7から10日間、プレート培地で培養し、プラークを得た。プラーク液をHEK293細胞に感染させ、拡大培養後、CsCl 精製法で2回精製してクレード C 型 HIVの挿入された Ad5/35-C型HIV/env/gag ベクターを得た。

[0032] (2) IFN- $\gamma$  ELISpot アッセイによる評価

マウス IFN- $\gamma$  用の ELIS ポットアッセイキット (Cat. 3321-2A-2, MabTech, Nacka, Sweden) を用いて、最終免疫1週間後に、製作者の指針に沿って IFN- $\gamma$  産生細胞を定量した。

即ち、マルチスクリーン-IP プレート (Millipore, Bedford, MA) を 70% エタノールおよび PBS で洗浄した。プレートを、PBS 中の 10  $\mu$ g/ml 抗マウスIFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 (An18) で 4°C 一晩コート処理した。次いで、プレートを洗浄し、RPMI-1640 および 10% FCS で室温で 2 時間ブロックした。脾臓もしくは腸リンパ節から単離したリンパ球 (1-10  $\times 10^5$ ) を各ウェルに加えた。リンパ球を、10  $\mu$ g/ml HIV クレードC V3 ペプチド (NNTRQSIRIGPGQTFYATGDIIGD) および HIV クレードC gag ペプチド (DIKQGPKESFRDYVDRFFKTLR) で 37°C で 24 時間刺激促進した。非刺激促進細胞を含むウェルをコントロールウェルとした。インキュベーション後に、プレートを洗浄し、次いで、1  $\mu$ g/ml ビオチン化抗マウス IFN- $\gamma$  抗体 (R4-6A2)、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ次いで 50  $\mu$ l/well BCIP/NBT ホスファターゼ基質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) でインキュベートした。スポット数を、コンピュータービデオイメージ分析器 (KS Elispot, Carl Zeiss, Co., Ltd., Tokyo, Japan) で自動計測した。すべての実験は 3 回行った。

Ad5/35-LacZ または Ad5/35-C型HIV/env/gag の  $10^{10}$  粒子を BALB/c マウスに

筋肉内注射した。免疫後 2 週間で、HIV 特異的 IFN- $\gamma$  分泌脾臓細胞を検出した。得られた結果を、図13に示した。

[0033] (3)結果

図13に示した結果から分かるように、非免疫マウスおよび Ad5/35-LacZ 投与マウスでは、50 SPC/million 以下の IFN- $\gamma$  分泌脾臓細胞しか観察されなかった。他方、env ペプチドまたは gag ペプチドで刺激しAd5/35-C型HIV/env/gag 投与マウスでは、有意に高い HIV 特異的 IFN- $\gamma$  分泌脾臓細胞を検出した。

産業上の利用可能性

[0034] 本発明により、HIV env 遺伝子を発現するキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターが、強い抗原特異的細胞性免疫反応を惹起することを明らかにされた。これは現在 HIV ワクチンとして最有力視されている MVA ベクター以上に強い免疫反応である。さらに、マウスモデルにおいて、キメラ Ad5/F35-HIV ベクターとDNA ワクチンを組み合わせた複合型ワクチンが、ウイルス感染に対する長期的な防御反応が誘導することも判明した。これらの結果は、AIDS の蔓延を抑制する画期的な HIVワクチンの開発の可能性を示唆していると言える。

抗原特異的細胞性免疫および中和抗体は、HIVの感染防御において大変重要である。DNAワクチンと本発明の HIV env 遺伝子を発現するキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターを組み合わせる用いることにより、特異的な抗体に対するほぼ最高値の細胞性免疫が誘導されることが分かった。さらに、この複合型ワクチンは長期的な防御性免疫応答を誘導できることも明らかになった。

また、本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、高活性抗レトロウイルス療法 (HAART) に用いられている抗 HIV 剤とともに用いることもできる本発明のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、従来の Ad5 ベクターを臨床治療に用いる際の最大の障壁となっている肝臓への副作用が少なく、ヒト樹状細胞に高い親和性を持っており、このことからヒトでの臨床試験におけるめざましい成果が期待できる。

細胞性および体液性免疫を誘導できる安全で有効性の高い、かつ安価なワクチンは HIV の拡大を抑制するために大変重要である。そこで、本発明のキメラ 5 型/11

型もしくは 35 型アデノウイルスベクターは、AIDSの蔓延を抑制する大きな可能性を秘めた次世代のワクチンとなりうるものである。

#### 図面の簡単な説明

[0035] [図1]図1は、組換えウイルス MVA-HIV、vPE16、Ad5/F35-HIVを電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、マウス抗 HIV gp120 モノクローナル抗体を用いてX線フィルムに感光させ、HIV gp 160 蛋白質を確認した図を示す。

[図2]図2は、各種組換えウイルスをマウスで免疫したときの免疫スケジュールを示す。

[図3]図3は、Ad5 ベクター (Ad5-LacZ) および Ad5/F35 ベクター (Ad5/F35-LacZ) の細胞毒性を調べた結果を示す。免疫時の 10 倍の量である  $10^{11}$  particles の組換え Ad5 ベクター (Ad5-LacZ) または Ad5/F35 ベクター (Ad5/F35-LacZ) を BALB/c マウスの静脈または腹腔内に投与した ( $n = 3$ ) 時の、肝臓および腎臓に対する細胞毒性は、マウスの血清を用いて投与後6日目に測定した。

[図4]図4は、組換えウイルス Ad5/F35-HIV をマウスに免疫した時の HIV 特異的免疫反応を経時的にテトラマーアッセイにより測定した結果を示す。0 日目に  $10^{10}$  particles の Ad5/F35-HIV ベクターを様々な経路で投与した。図中の時間における HIV 特異的 CD8<sup>+</sup> 細胞の割合を検出した。値は 4 または 5 匹のマウスの平均値である。図中、i.m. は筋肉、i.d. は皮内、i.p. は腹腔内、s.c. は皮下投与を示し、Ad5/F35-LacZ は LacZ タンパクを発現する Ad5/F35-LacZ ベクターであり、ネガティブコントロールとして用いた。

[図5]図5は、組換えウイルス Ad5/F35-HIV をマウスに免疫した時の HIV 特異的免疫反応を経時的に ICCS アッセイにより測定した結果を示す。0 日目に  $10^{10}$  particles の Ad5/F35-HIV ベクターを様々な経路で投与した。図中の時間における HIV 特異的 CD8<sup>+</sup> 細胞の割合を検出した。値は 4 または 5 匹のマウスの平均値である。図中、i.m. は筋肉、i.d. は皮内、i.p. は腹腔内、s.c. は皮下投与を示し、Ad5/F35-LacZ は LacZ タンパクを発現する Ad5/F35-LacZ ベクターであり、ネガティブコントロールとして用いた。

[図6]本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫した後の免疫応答を示す。DNA ワクチン(

pCAGrev/env)、ウイルスベクター(Ad5/F35-HIV)( $10^{10}$  particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m あるいは i.d. でマウスに投与した。最終免疫後 2 週間目に HIV 特異的免疫反応をテトラマーアッセイによる検出した。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は 10 匹のマウスの平均値を示す。

[図7]本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫した後の免疫応答を示す。DNA ワクチン(pCAGrev/env)、ウイルスベクター(Ad5/F35-HIV)( $10^{10}$  particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m あるいは i.d. でマウスに投与した。最終免疫後2週間目に HIV 特異的免疫反応を ICCS により検出した。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は 10 匹のマウスの平均値を示す。

[図8]本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫、それに続くウイルス感染後の免疫応答を示す。DNAワクチン(pCAGrev/env)、ウイルスベクター(Ad5/F35-HIV)( $10^{10}$  particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m あるいは i.d. でマウスに投与した。図2に示したスケジュールで免疫し、最終免疫の 2 週間後(週 5)に  $10^8$  pfu/mouse の vPE16 ワクチニアウイルスを i.p.で投与し、その 1 週間後(週 6)免疫応答を示す。値は 6-10 匹のマウスの平均値で示した。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は 10 匹のマウスの平均値を示す。

[図9]本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫、それに続くウイルス感染後の免疫応答。DNAワクチン(pCAGrev/env)、ウイルスベクター(Ad5/F35-HIV)( $10^{10}$  particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m あるいは i.d. でマウスに投与した。図2に示したスケジュールの週 5 に  $10^8$  pfu/mouse vPE16 ワクチニアウイルスを i.p.で投与した週 6 の感染させたマウスの卵巣におけるワクチニアウイルス力価を示す。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は 10 匹のマウスの平均値を示す。

[図10]図10は、最終免疫後7週間目の免疫応答と感染実験の結果を示す。DNA ワクチン(pCAGrev/env)、ウイルスベクター(Ad5/F35-HIV)( $10^{10}$  particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m あるいは i.d. でマウスに投与して免疫を行った。最終免疫後 7 週間目にテトラマーアッセイによって検出した HIV-特異的免疫反応の測定結果を示す。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は 10 匹

のマウスの平均値を示す。

[図11]図11は、最終免疫後7週間目の免疫応答と感染実験の結果を示す。DNAワクチン(pCAGrev/env)、ウイルスベクター(Ad5/F35-HIV)( $10^{10}$  particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m あるいは i.d. でマウスに投与して免疫を行った。最終免疫後 7 週間目の感染させたマウス卵巣におけるワクチニアウイルス力価を示す。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は 10 匹のマウスの平均値を示す。

[図12]図12は、ウイルスベクター(Ad5/F35-HIV、MVA-HIV、rPE16)の力価を示し、20 個の 15cm ディッシュから得られたウイルスの力価を示した。

[図13]図13は、非免疫マウス、Ad5/35-LacZ 投与マウスおよび本発明の Ad5/35-C 型 HIV/env/gag 投与マウスにおける、HIV 特異的 IFN- $\gamma$  分泌脾臓細胞の検出した結果を示す。

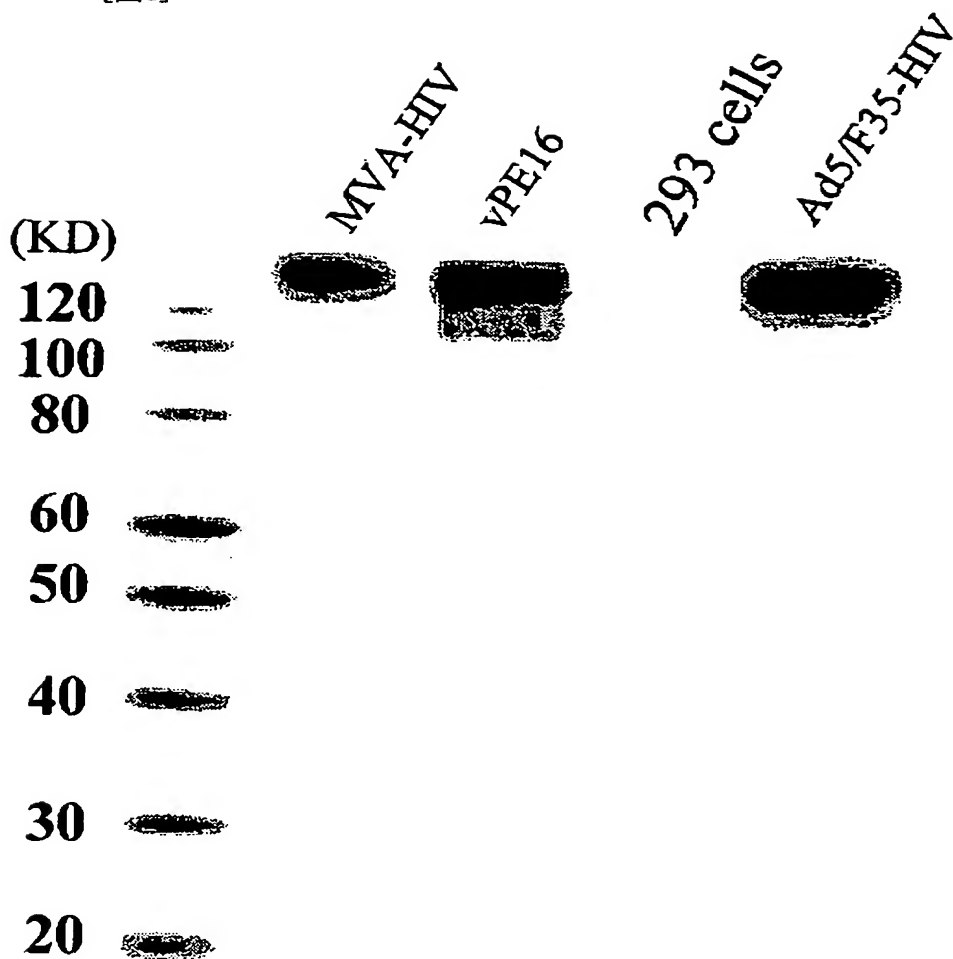
## 請求の範囲

- [1] 非増殖型 5 型アデノウイルスに、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれており、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が、11 型もしくは 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されているキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクター。
- [2] クレード B 型 HIV またはクレード C 型 HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれた請求項1に記載のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクター。
- [3] 更に、HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子と共に、HIV の gag 遺伝子もしくはその変異遺伝子が発現可能なように組み込まれた請求項1または2に記載のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクター。
- [4] 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が、35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されている請求項1から3のいずれかに記載のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクター。
- [5] 非増殖型 5 型アデノウイルスが、E1 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスまたは E1 および E3 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスである請求項1から4のいずれかに記載のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクター。
- [6] 請求項1から5のいずれかに記載のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターを有効成分とする医薬組成物。
- [7] 抗 HIV 感染防御用である請求項6に記載の医薬組成物。
- [8] HIV ワクチンである請求項6または7に記載の医薬組成物。
- [9] HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれた非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターとともに用いるための請求項6から8のいずれかに記載の医薬組成物。



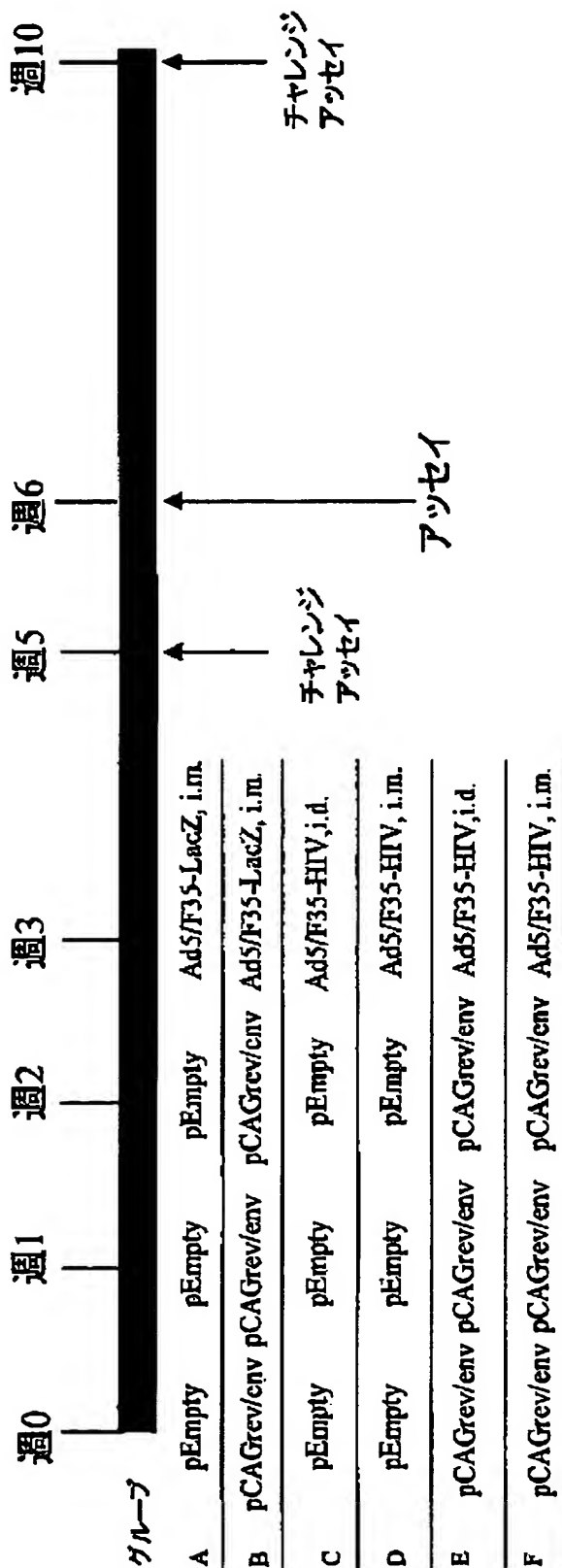
- [10] 抗 HIV 剤とともに用いるための請求項6から8のいずれかに記載の医薬組成物。
- [11] 抗 HIV 剤が、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤から選ばれる少なくとも一種である請求項10に記載の医薬組成物。
- [12] 請求項1から5のいずれかに記載のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターおよび HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれた非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを投与することからなる、HIV 感染防御もしくは HIV 用ワクチン化方法。
- [13] 請求項1から5のいずれかに記載のキメラ 5 型/11 型もしくは 35 型アデノウイルスベクターおよび 抗 HIV 剤を投与することからなる、HIV 感染防御もしくは HIV 用ワクチン化方法。

[図1]



[図2]

# 免疫及びアッセイスケジュール



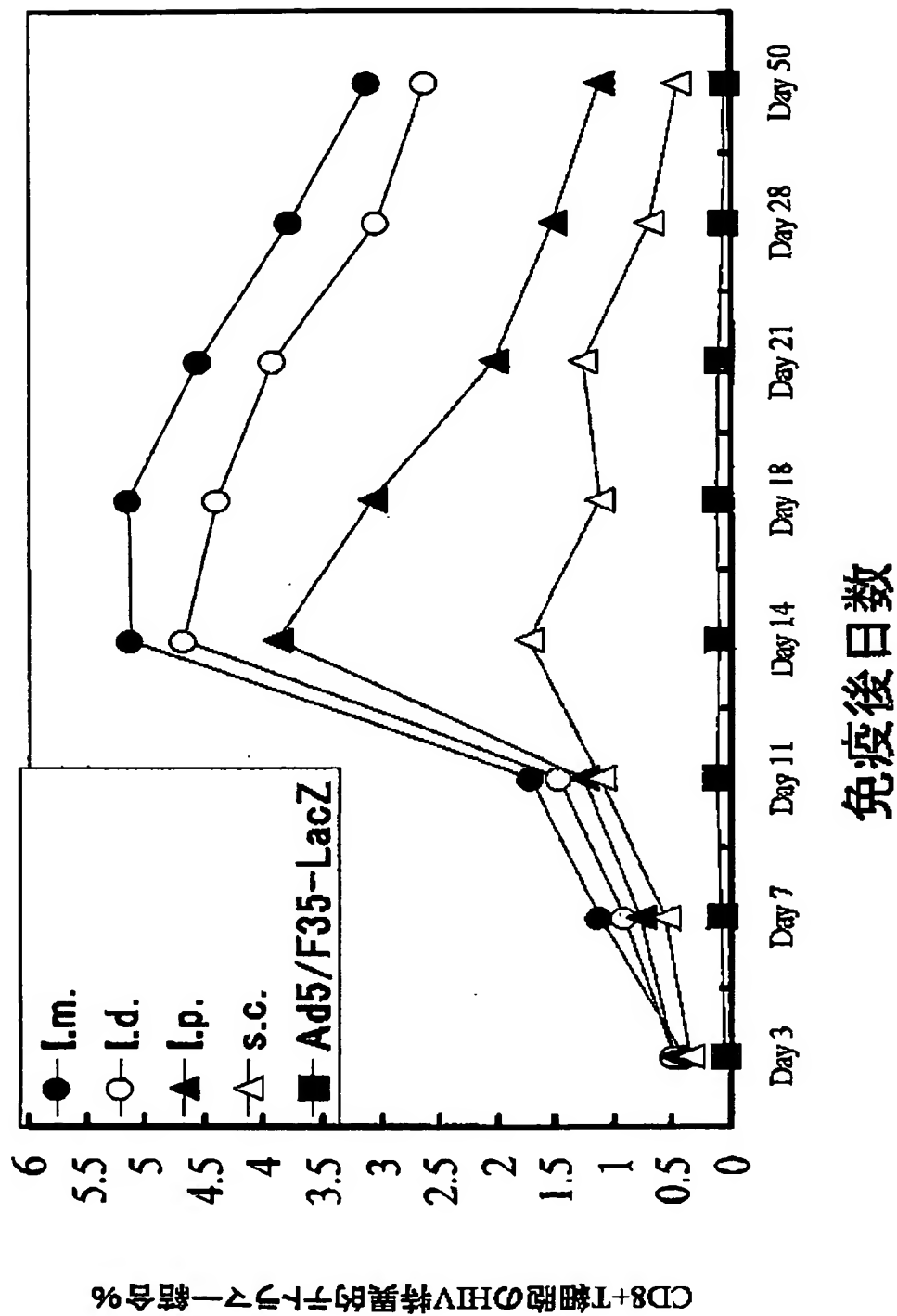
[図3]

## BALB/cマウスにおける細胞毒性

	臨床テスト	スタンダード	Ad5-lacZ		Ad5/F35-lacZ	
			静脈投与	腹内投与	静脈投与	腹内投与
肝臓機能	GOT	10-40	1099	100	113	56
	GPT	6-40	1504	53	123	27
腎臓機能	尿酸	8-20	23	23	24	26
	CHO	0.6-1.3	0.43	0.42	0.43	0.43
	NA	135-147	150	151	151	150
	K	3.5-5.1	5.3	6.0	5.6	6.0

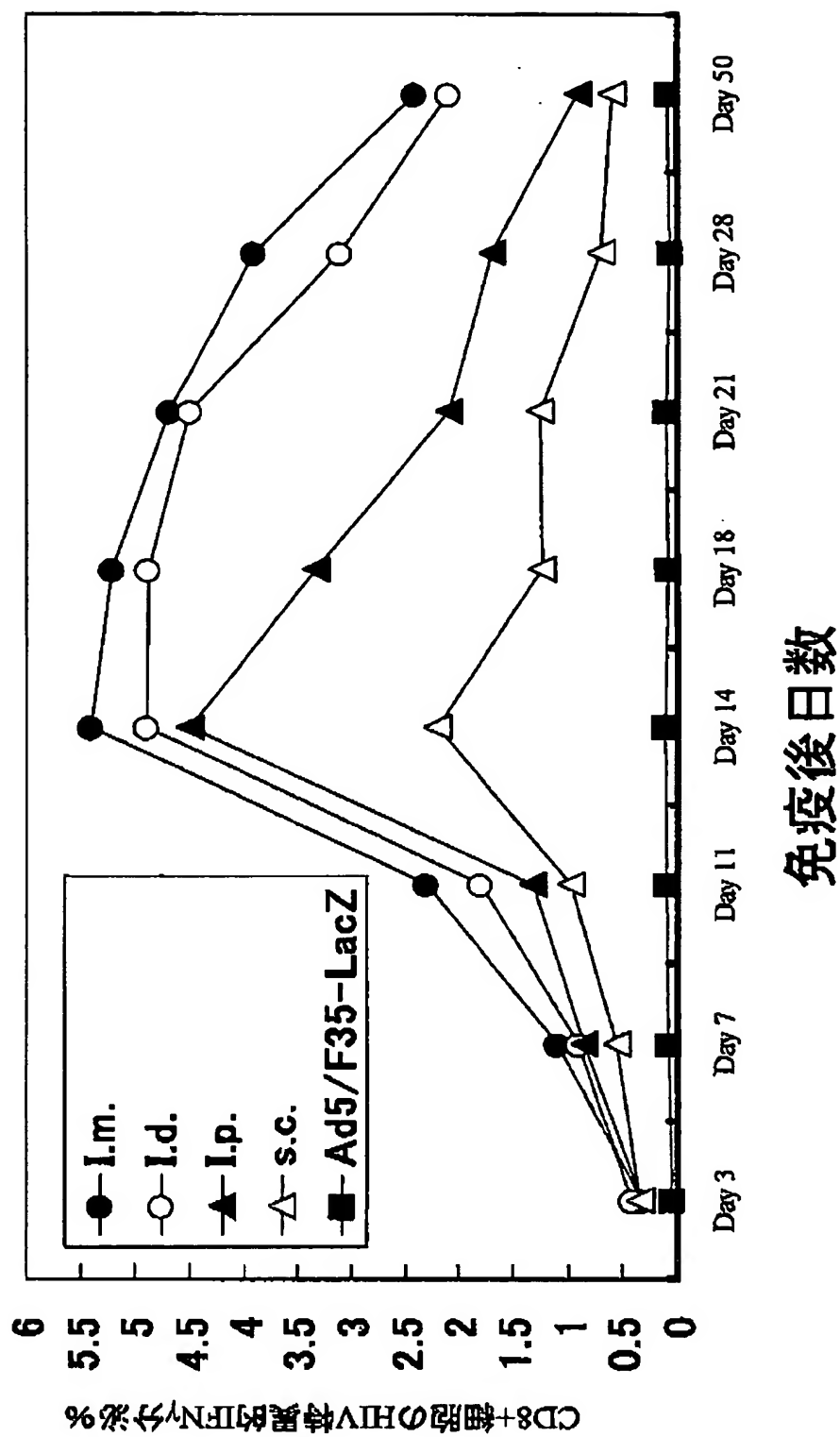
[図4]

## テトラマーアッセイによる経時的免疫反応

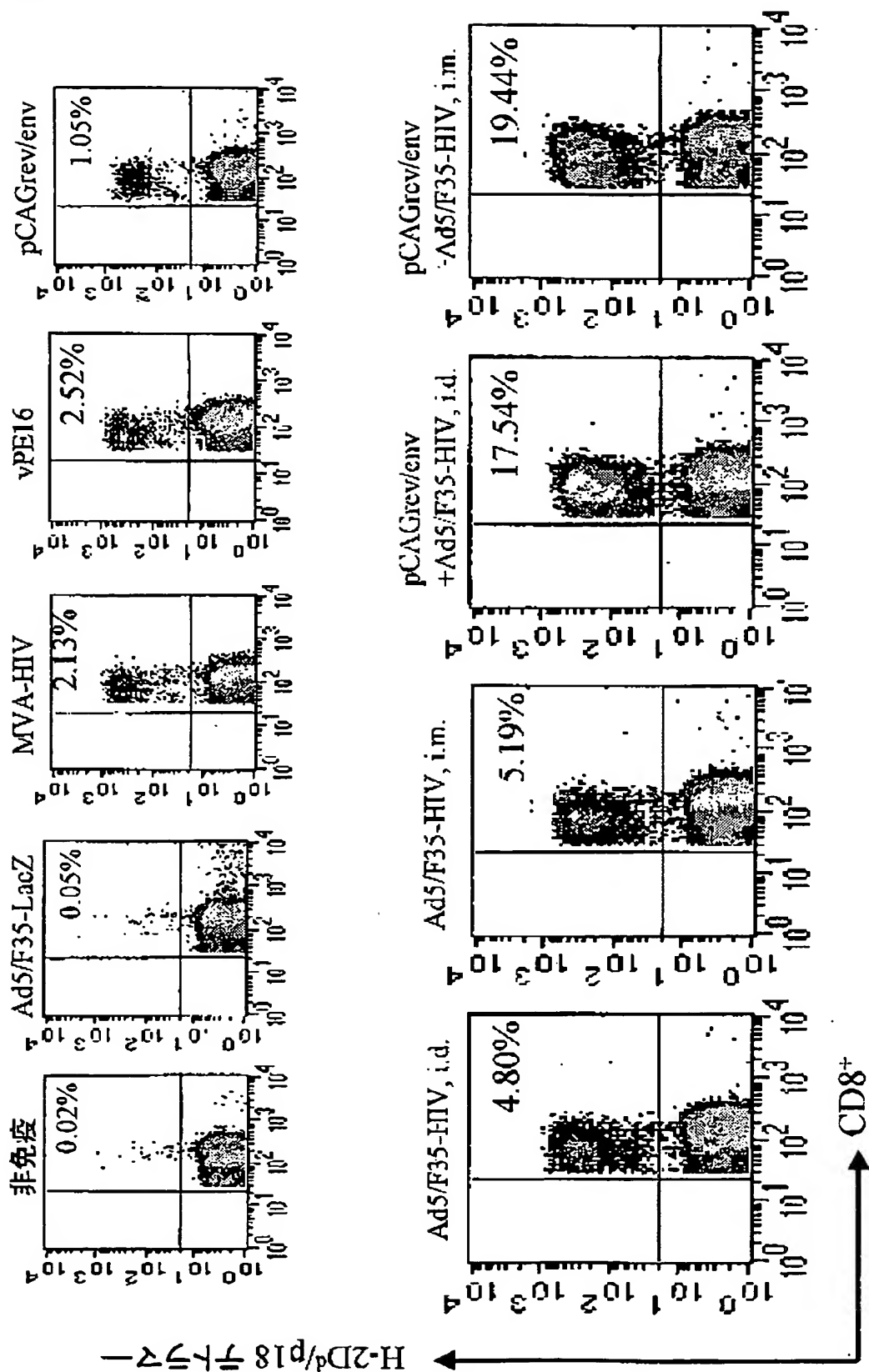


[図5]

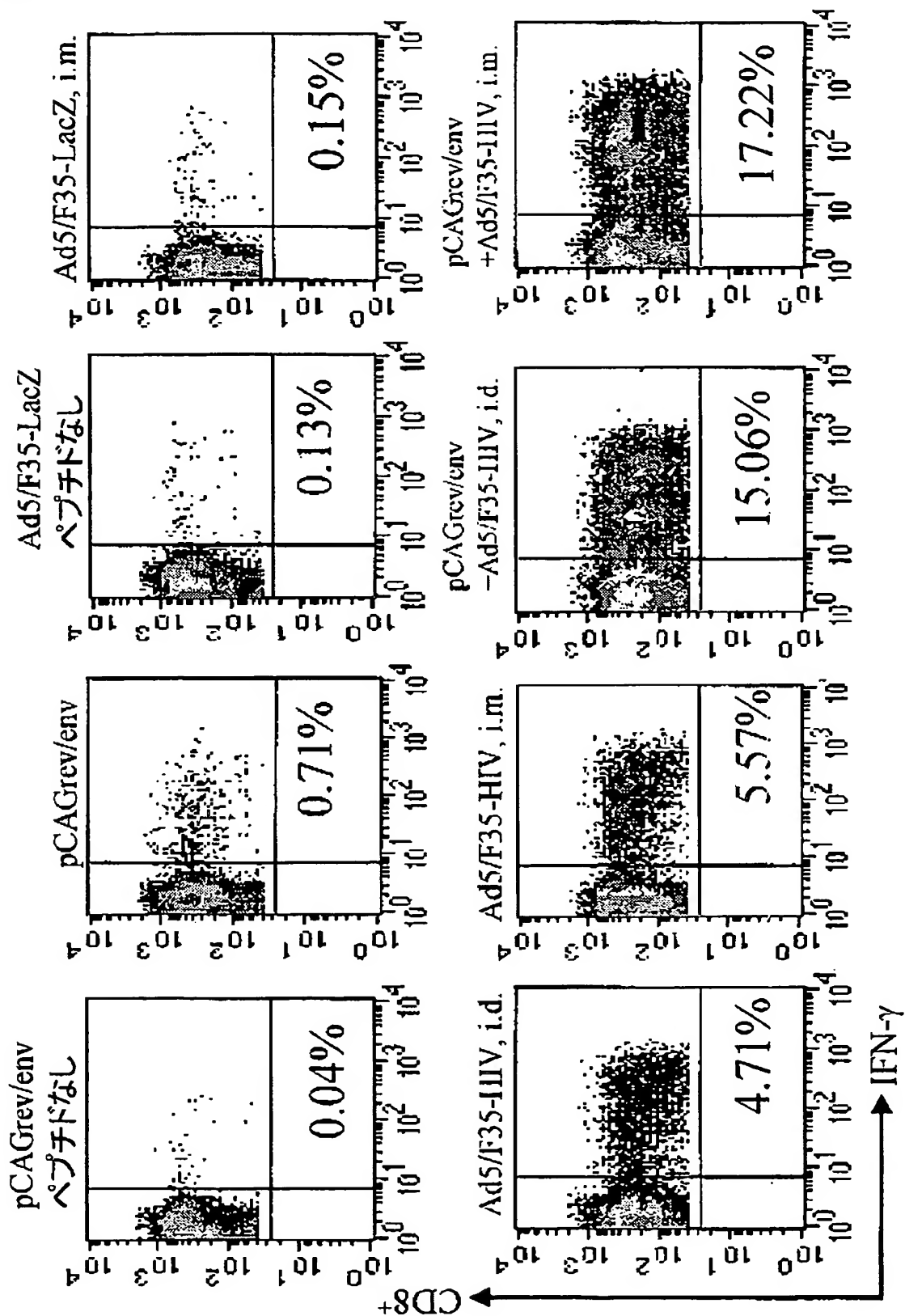
# ICCSアッセイによる経時的免疫反応



[図6]

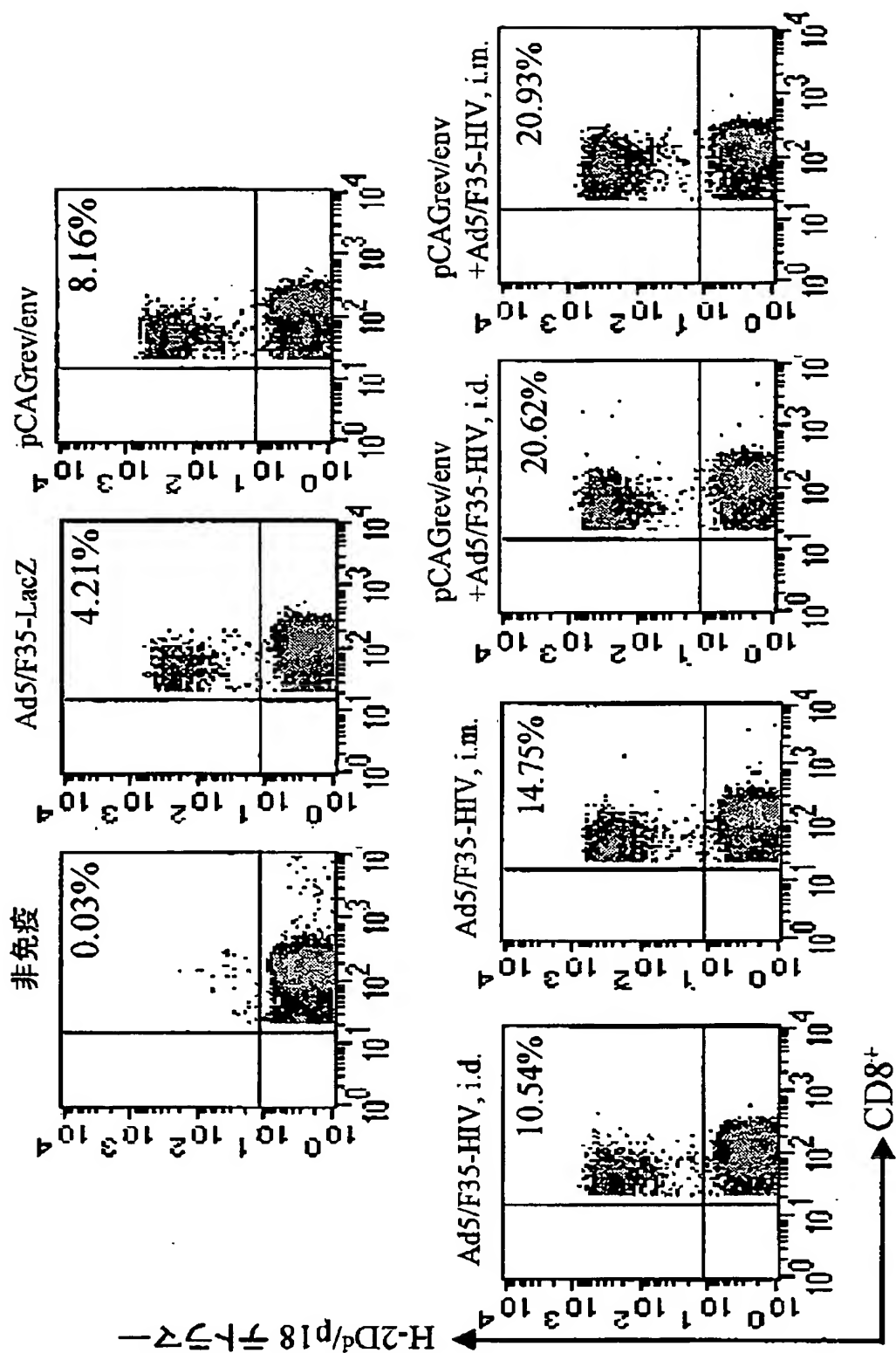


[図7]



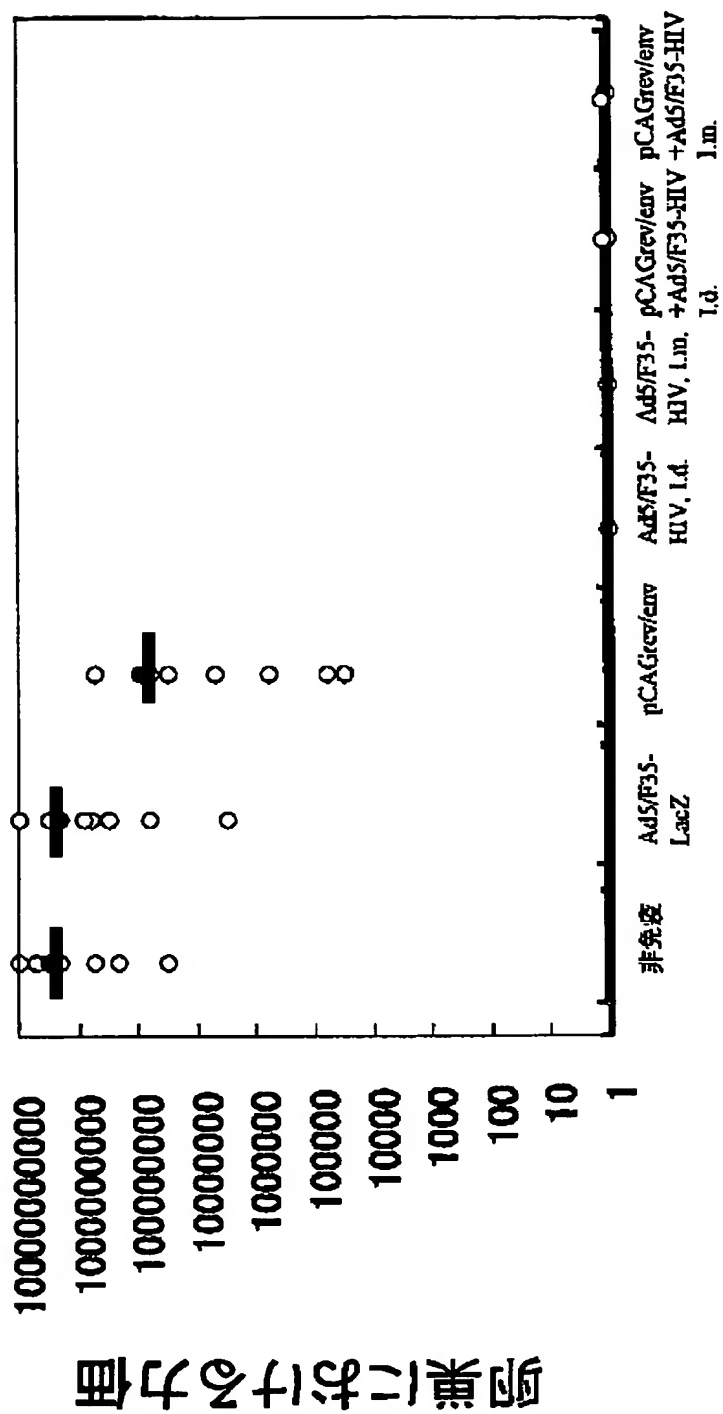


[図8]

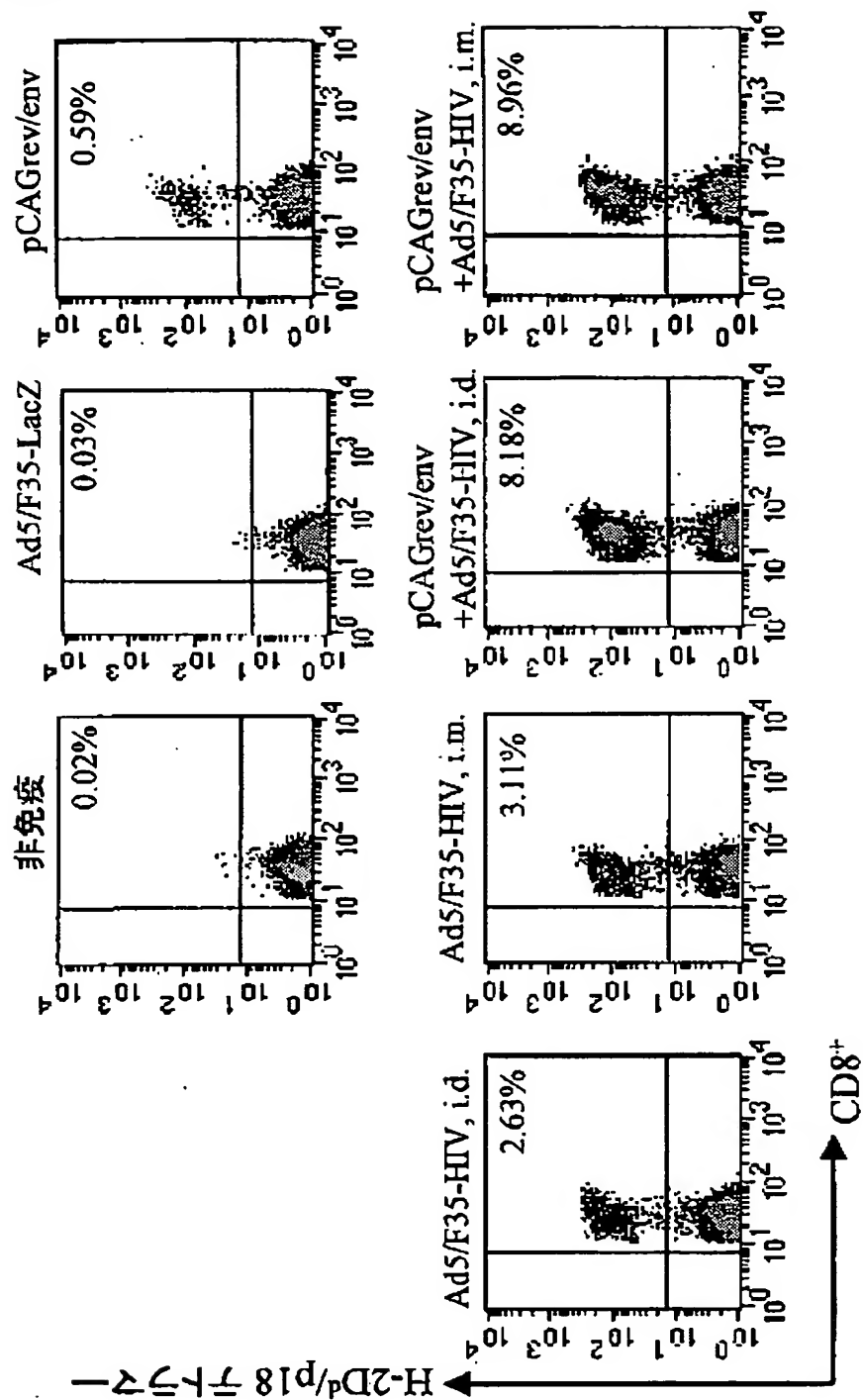


[図9]

# 最終免疫後2週間目のチャレンジ

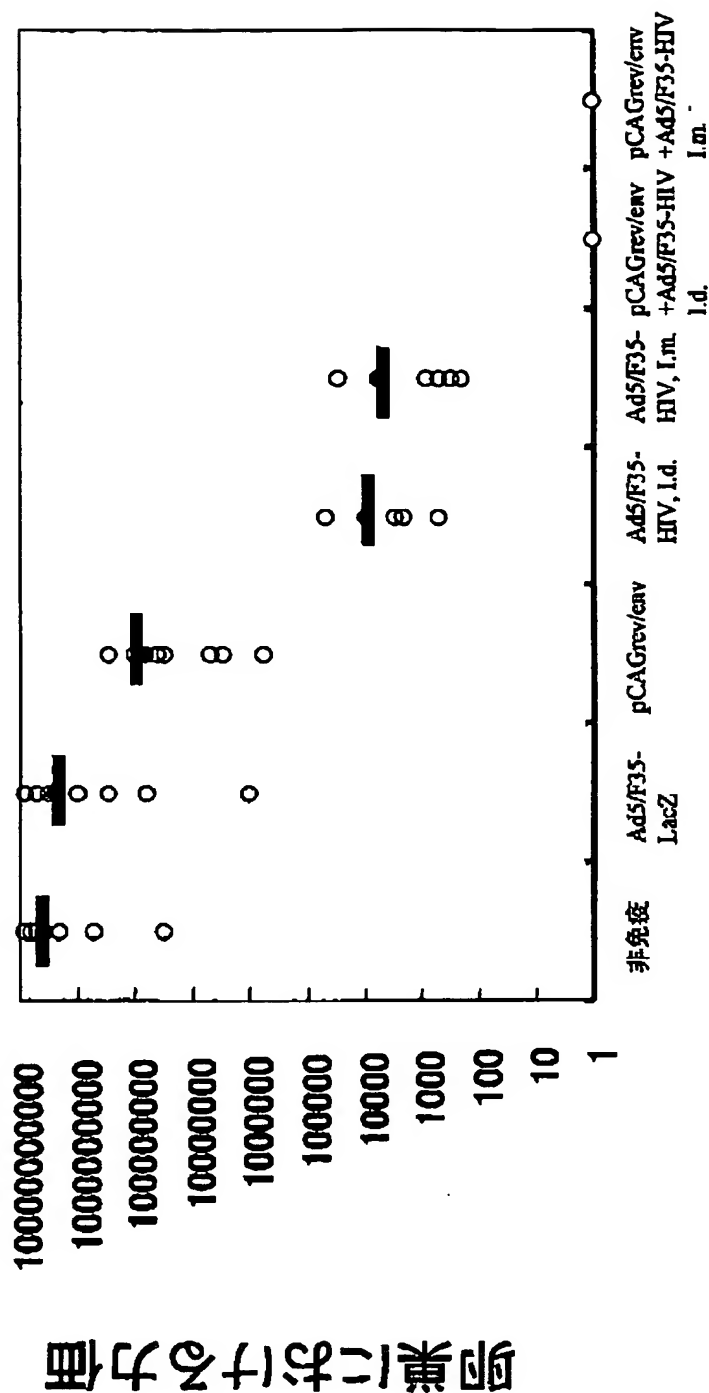


[図10]



[図11]

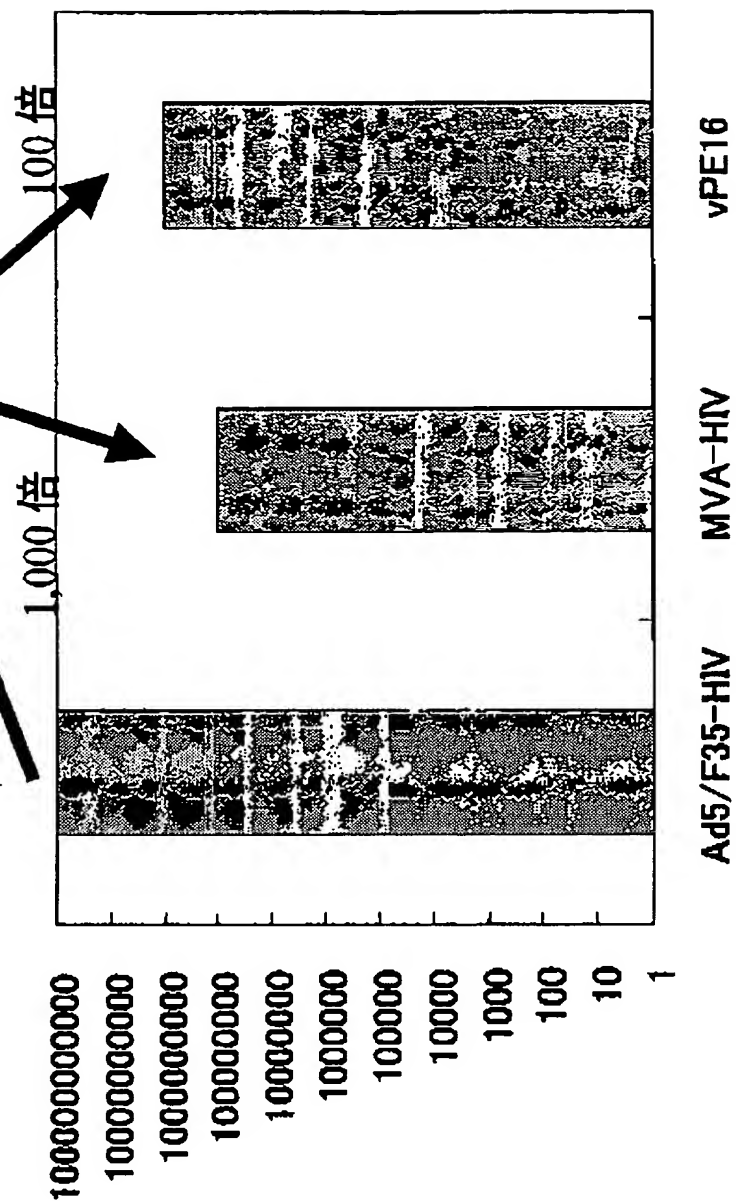
# 最終免疫後7週間目のチャレンジ



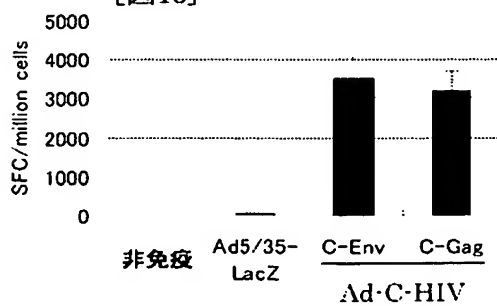
[図12]

# 15cm Ⅲ x20からのウイルスカ価

ウイルスカ価



[図13]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2004/017375

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/63, C12N7/01, A61K35/76, A61K48/00, A61P31/18,  
A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/63, C12N7/01, A61K35/76, A61K48/00, A61P31/18,  
A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Rea D. et al., Highly efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells with subgroup B fiber-modified adenovirus vectors enhances transgene-encoded antigen presentation to cytotoxic T cells, J. Immunol., 2001, Vol.166, pages 5236 to 5244	1-11
X	Shayakhmetov D.M. et al., Efficient gene transfer into humanCD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector, J.Virol., 2000, Vol.74, pages 2567 to 2583	1-11
X	Mizuguchi H. et al., Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes, Gene, 2002, Vol.285, pages 69 to 77	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
25 January, 2005 (25.01.05)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017375

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-501041 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON), 14 January, 2003 (14.01.03), Full text & WO 2000/073478 A2 & EP 1181382 A2 & AU 200054640 A	1-11
Y	Yoshida T. et al., Activation of HIV-1-specific immune responses to an HIV-1 vaccine constructed from a replication-defective adenovirus vector using various combinations of immunization protocols, Clin.Exp.Immunol., 2001, Vol.124, pages 445 to 452	1-11
Y	Casimiro D.R. et al., Vaccine-induced immunity in baboons by using DNA and replication- incompetent adenovirus type 5 vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene, J.Virol., 2003 July, Vol.77, pages 7663 to 7668	1-11
Y	Luo L. et al., Budding and secretion of HIV Gag-Env virus-like particles from recombinant human adenovirus infected cells, Virus Res., 2003 Mar., Vol.92, pages 75 to 82	1-11
Y	Shiver J.W. et al., Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity, Nature, 2002, Vol.415, pages 331 to 335	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017375

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12, 13  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 12 and 13 are relevant to methods for treatment of the human body by therapy under the Rule 39.1(iv) of the PCT Regulations.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/63, C12N7/01, A61K35/76, A61K48/00, A61P31/18, A61P37/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/63, C12N7/01, A61K35/76, A61K48/00, A61P31/18, A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Rea D. et al., Highly efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells with subgroup B fiber-modified adenovirus vectors enhances transgene-encoded antigen presentation to cytotoxic T cells, J. Immunol., 2001, Vol.166, p.5236-5244	1-11
X	Shayakhmetov D. M. et al., Efficient gene transfer into humanCD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector, J. Virol., 2000, Vol.74, p.2567-2583	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.01.2005

国際調査報告の発送日

08.02.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Mizuguchi H. et al., Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes, Gene, 2002, Vol.285, p.69-77	1-11
X	JP 2003-501041 A (ユニバーシティ オブ ワシントン) 2003.01.14, 全文 & WO 2000/073478 A2 & EP 1181382 A2 & AU 200054640 A	1-11
Y	Yoshida T. et al., Activation of HIV-1-specific immune responses to an HIV-1 vaccine constructed from a replication-defective adenovirus vector using various combinations of immunization protocols, Clin. Exp. Immunol., 2001, Vol.124, p.445-452	1-11
Y	Casimiro D. R. et al., Vaccine-induced immunity in baboons by using DNA and replication-incompetent adenovirus type 5 vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene, J. Virol., 2003 July, Vol.77, p.7663-7668	1-11
Y	Luo L. et al., Budding and secretion of HIV Gag-Env virus-like particles from recombinant human adenovirus infected cells, Virus Res., 2003 Mar., Vol.92, p.75-82	1-11
Y	Shiver J. W. et al., Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity, Nature, 2002, Vol.415, p.331-335	1-11

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 12、13 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲12、13に記載されている発明は、PCT規則39.1(iv)の人の身体の治療による処置方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**